

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-165933

(P2001-165933A)

(43) 公開日 平成13年6月22日 (2001.6.22)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
G 0 1 N 33/573		G 0 1 N 33/573	A 4 B 0 2 4
			Z 4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/40		C 0 7 K 16/40	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/42	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/42		C 1 2 P 21/00	Z
審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 6 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-347420

(22) 出願日 平成11年12月7日 (1999.12.7)

(71) 出願人 000207827

大腸薬品工業株式会社

東京都千代田区神田錦町1-27

(72) 発明者 松尾 憲一

埼玉県飯能市美杉台3-1-8

(72) 発明者 山田 雄次

東京都東大和市南街3-41-11

(72) 発明者 河野 公俊

福岡県北九州市八幡西区大浦3-15-3-306

(74) 代理人 100068700

弁理士 有賀 三幸 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 予後判定方法

(57) 【要約】

【解決手段】 腺癌組織中のG a l N A c T 3を測定することを特徴とする腺癌患者の予後判定方法、腺癌組織中のG a l N A c T 3測定試薬からなる腺癌患者の予後検査薬、及び配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体。

【効果】 大腸癌、胃癌等の腺癌患者の予後を、経過観察を行わずに簡易に判定することができ、臨床診断や治療法の決定において有力な情報を与える。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 腺癌組織中のGalNAcT3を測定することを特徴とする腺癌患者の予後判定方法。

【請求項2】 抗GalNAcT3抗体を用いてGalNAcT3を測定するものである請求項1記載の腺癌患者の予後判定方法。

【請求項3】 抗GalNAcT3抗体が、配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体である請求項2記載の腺癌患者の予後判定方法。

【請求項4】 腺癌が、大腸癌又は胃癌である請求項1～3のいずれか1項記載の腺癌患者の予後判定方法。

【請求項5】 腺癌組織中のGalNAcT3測定試薬からなる腺癌患者の予後検査薬。

【請求項6】 GalNAcT3測定試薬が、抗GalNAcT3抗体を含むものである請求項5記載の腺癌患者の予後検査薬。

【請求項7】 抗GalNAcT3抗体が、配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体である請求項6記載の腺癌患者の予後検査薬。

【請求項8】 腺癌が、大腸癌又は胃癌である請求項5～7のいずれか1項記載の腺癌患者の予後検査薬。

【請求項9】 配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、N-アセチルガラクトサミントランスフェラーゼ3（以下「GalNAcT3」という）を用いた腺癌患者の予後判定方法及び予後検査薬に関する。

【0002】

【従来の技術】癌の早期発見のための診断法の確立は、癌の治療成績を向上させるための重要な課題であり、例えば癌化によって変異を受けた細胞表面の糖蛋白又は糖脂質上の糖鎖に対する抗体が、いわゆる癌マーカーとして膵臓癌や卵巣癌の診断に用いられている（CA19-9、CA125等）。

【0003】一方、癌の治療法や治療時期を決定する上では、早期診断のみならず、確定診断或いは手術後の予後因子の解析法を確立することも重要である。過去には、手術などにより摘出した腫瘍組織の分化度を評価することにより予後を推定する方法が採られていたが、分化度が独立した予後規定因子であるかどうかは不明であり、また組織学的分化度は判定者の主観に依存し、予後判定が不正確になりがちであった。更に、大腸癌においては高分化腺癌が多く、中分化・低分化腺癌が少ないこともあり組織像自体はあまり考慮されないこと、組織型で診断するには診断の再現性が難しいこと、或いは評価が困難である例が存在し分化度の組織診断が曖昧なものになる等の問題があり、予後を判定することは困難であるとされていた（消化器内視鏡Vol.8 No.7 963-964(199

6)、同Vol.8 No.7 969-972(1996))。

【0004】その後、癌患者の予後を判定する方法としては、血管新生に関連する血管透過性因子（VFP）を検出することによって予後を判定するもの（特開平6-281649号公報）、タンパク質チロシンホスファターゼ α （PTP α ）を用いた結腸直腸癌の予後判定法（特開平8-56699号公報）、特定の遺伝子の突然変異の状況を観察することより新生物組織の予後を判定するもの（特表平6-509701号公報、特表平7-500241号公報）等が知られるようになった。しかし、これまでの予後因子による判定は、術後の経過を随時追跡することを必要としたり、検出が複雑である等の問題があり、実際の臨床の場で即時的に簡便に利用することは困難である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、大腸癌、胃癌等の腺癌患者の予後を簡易に診断するための方法及び診断薬を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、斯かる実情の下、GalNAcT3が、腺組織に特異的に発現していることに着目し、当該組織が癌化して脱分化した場合の組織学的脱分化度とGalNAcT3の発現量及び癌患者の生存期間との関連性を検討した結果、GalNAcT3の発現量と癌患者の生存期間には組織学的分化度とは別に独立して有意な相関性が認められ、腺癌組織中のGalNAcT3の発現量を測定することにより患者の予後を判定できること、更に特定の抗GalNAcT3抗体を用いることにより当該GalNAcT3を特異的に測定できることを見出し、本発明を完成した。

【0007】即ち本発明は、腺癌組織中のGalNAcT3を測定することを特徴とする腺癌患者の予後判定方法を提供するものである。

【0008】また本発明は、腺癌組織中のGalNAcT3測定試薬からなる腺癌患者の予後検査薬を提供するものである。

【0009】更に本発明は、配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体を提供するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明の予後判定方法は、腺癌組織中のGalNAcT3を測定することを特徴とするものである。

【0011】GalNAcT3は、現在までに6種類のアイソザイムの存在が知られているN-アセチルガラクトサミントランスフェラーゼ（GalNAcT）1～6の一つであり、細胞表面のムチン型（O型）糖鎖をもつ糖蛋白質の生合成において、その起点となる蛋白質のセリン又はトレオニン残基にN-アセチルガラクトサミンを結合させる反応に関与する酵素である。

【0012】最近、本発明者らは、GalNAcT3

が、腺組織に特異的に発現していることを見出し、また癌との関連では、Ga1NAcT3が分化型腺癌細胞で発現し、低分化型腺癌細胞では発現しないという報告がなされている(Sutherland et al., Cancer Res. 57, 4744-4748(1997))。しかし、Ga1NAcT3の臨床的意義は明らかにされておらず、腺癌組織中のGa1NAcT3の発現量が癌患者の生存期間と高い相関を示すことは全く予測することができなかったことである。

【0013】本発明の予後判定方法において用いられる腺癌組織とは、胃癌、大腸癌、甲状腺癌、乳癌、前立腺癌、肺癌、すい臓癌等の腺癌が発症した腺組織であり、具体的には、手術や生検等によって摘出された癌組織が用いられる。

【0014】本発明の予後判定方法におけるGa1NAcT3の測定は、摘出された癌組織中のGa1NAcT3を特異的に検出できる方法であれば特に限定されず、例えば酵素免疫測定(染色)法、ELISA法等の免疫学的手法を挙げることができ、Ga1NAcT3の有無を肉眼、顕微鏡下、吸光、蛍光等で判定することにより行われる。好ましい測定法としては、簡便性の点から抗Ga1NAcT3抗体を用いた免疫染色法が挙げられる。

【0015】従って、本発明の予後検査薬は、当該Ga1NAcT3測定試薬、即ち免疫学的測定試薬、好ましくは抗Ga1NAcT3抗体を含む免疫測定試薬が好ましい。

【0016】斯かる抗Ga1NAcT3抗体としては、Ga1NAcT3を特異的に認識できるものであれば特に限定されないが、通常はGa1NAcT3又はそれと同等の抗原性を有するペプチド、例えばGa1NAcT3タンパク中の特定のアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体が挙げられ、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体のいずれでもよい。

【0017】ここで、Ga1NAcT3中の特定のアミノ酸配列を有するペプチドの選定方法としては、例えば、Ga1NAcT3のアミノ酸配列から、Genome Net内のアミノ酸配列より3次元構造を推定するモデリングツールを用いてGa1NAcT3の立体構造を推定し、その表面に露出しているアミノ酸配列のうちのGa1NAcT(例えば、Ga1NAcT1、Ga1NAcT2等)のアミノ酸配列と相違する部分を抽出する方法が挙げられる。

【0018】斯かる手法により選定された好適なペプチドとして、例えばヒトGa1NAcT3タンパクの一部である配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチド又は該ペプチドを含有するペプチドが挙げられ、該ペプチドに対する抗体は、高い抗体価を有する新規抗Ga1NAcT3抗体として有用である。

【0019】尚、これらのペプチド類は、ペプチド合成機等を用いて化学合成することにより得ることができ

る。

【0020】抗Ga1NAcT3抗体の調製は常法に従って行なわれるが、例えば以下の操作によればGa1NAcT3に対するポリクローナル抗体を得ることができる。即ち、1) ペプチド(例えば配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるペプチド)をEDC等の架橋剤によりアセチル化牛血清アルブミン(BSA)等のキャリアー蛋白と結合し、免疫用コンジュゲートを作成する。2) これを注射直前に完全もしくは不完全フロイントアジュバント中で乳化、懸濁させ、ウサギ、ヤギ、ウマ等の動物の皮下又は腹腔内に2~3週間毎に数回(好ましくは3~4回)注射を繰り返すことにより動物を免疫する。3) 最終免疫より約5~7日後、免疫動物から採血し、血清画分を常法に従って調整しポリクローナル抗体を得る。4) さらに、必要に応じてプロテインGセファロースカラム等により抗体を精製する。

【0021】斯かる方法により、正常腺組織及び腺癌組織中のGa1NAcT3の発現量を測定したところ、胃、大腸等の正常腺上皮細胞においては生涯活動期にあることから、Ga1NAcT3が多く発現され(図2参照)、一方、癌組織においてはGa1NAcT3が発現している場合(図3参照)と、その発現が消失している場合(図4参照)があった。そこで本発明においては、後記試験例に示すように、腺癌組織中のGa1NAcT3発現量と組織学的分化度及び生存期間と比較したところ、組織学的分化度に関係なく、患者の生存期間と有意に相関し、Ga1NAcT3を発現している場合には生存期間が長く、発現していない場合には生存期間が短いことが示された(図5参照)。即ち、本発明の予後判定法によれば、例えば手術時に摘出された腺癌組織についてGa1NAcT3量を測定し、解析することにより、その後の経過観察を行うことなく腺癌患者の予後を判定することができる。

【0022】本発明の予後検査薬の好ましい態様は、抗Ga1NAcT3抗体、特に配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチドに対する抗体を含むものであるが、当該抗Ga1NAcT3抗体は、標識された抗体でもよい。ここで標識抗体としては、放射性同位元素、酵素、蛍光色素、色素等が挙げられる。また、抗Ga1NAcT3抗体以外に第二抗体を含んでいてもよく、これは抗体作製時に用いた動物の免疫グロブリンに対する抗体が好ましく、例えば、ウサギを使用した場合は抗ウサギ抗体、ヤギを使用した場合は抗ヤギ抗体が好ましい。

【0023】

【実施例】実施例1 ポリクローナル抗体の製造

(1) アセチル化BSAの調製

BSA(SIGMA社製)200mgに20mlの50%酢酸ナトリウム溶液を徐々に加え、4℃に静置し溶解後、無水酢酸340μlを滴下、攪拌せずに4℃終夜静置して拡散させた。精製水2L×2回に透析して酢酸を除去

後、50mMリン酸緩衝液(PB) pH8.0(500ml)に透析してバッファー置換した。透析内容を回収してBIO-RAD社プロテインアッセイキットによりタンパク質濃度を測定、蛍光試薬によりアミノ基残存量を定量しアセチル化を確認した。

【0024】(2) ペプチドの導入

公知のGalNAcT3のアミノ酸配列から、Genome Net内のアミノ酸配列より3次元構造を推定するモデリングツールを用いてGalNAcT3の立体構造を推定し、その表面に露出しているアミノ酸配列のうち、GalNAcT1及びGalNAcT2のアミノ酸配列と相違する部分を抽出することにより選定されたアミノ酸配列のN末端にLysを付加した配列番号1のペプチドをペプチド合成機(Rainin社製)により作製し、それを少量とり50mM PB, pH8.0への溶解性が高いことを確認のち、アセチル化BSAへの導入を行った。

【0025】アセチル化BSA溶液(BSA量:10mg(1.5×10^{-7} mole))にモル比でペプチドの50倍となるように架橋剤であるEDC 70.9mg(3.7×10^{-4} mol)粉末を加え、溶解させた。次に約0.2mlの50mM PB, pH8.0に溶解した上記ペプチド(モル比でアセチル化BSAの50倍量)を加えVortex後、4℃終夜静置した。反応終了後あらかじめPBS(-)にて平衡化したPD-10に2mlの反応液をアプ
ライシ、0.5ml/tubeずつ分画した。回収したフラクションのタンパク質濃度、アミノ基残存量を定量し、上記ペプチドが導入されたことを確認した(アセチル化BSA1分子当たり16.6分子のペプチド)。

【0026】上記で得られたペプチド-BSA結合物は、完全フロイントアジュバントと混和後、ウサギ(SPE, 日本白色, 雄9週齢)の背部皮下に初回免疫した。その後、2週間隔で3回追加免疫を行った。免疫前及び各免疫後約1週間で採血、抗体価の推移を下記ELISA法で検定した。

【0027】(3) 抗体価測定方法

マイクロタイタープレートのwellに5, 2, 5, 1, 0, 0.5, 0.1 μ g/mlの濃度に調製した各ペプチド50 μ lを固相化した。1%ゼラチン-PBS(-)でブロッキング後、10倍~100000倍希釈(0.1%アセチル化BSAで希釈)した抗血清を50 μ lずつ添加し37℃、1時間反応させた。ウェルを0.05%Tween 20含有PBS(-)にて洗浄後、3000倍希釈したパーオキシダーゼ標識抗ウサギIgG(H+L)抗体50 μ lを加え、室温1時間静置した。ウェルを洗浄したのち基質溶液(O-Phenylenediamine)100 μ lを加えて室温5分間反応させた。高い反応値が得ら*

*れる抗原濃度と抗血清の希釈率の条件をキャリブレーションカーブ(図1)より求めた。これより、抗原濃度は0.5 μ g/ml、抗血清の希釈率は1000~100万倍と決定した。4回の免疫により約10万倍以上の抗体価が認められたため、全血の採血を行ない血清画分を得た。

【0028】以上のようにして得られた抗血清を用いて、下記試験例1に示すとおり正常粘膜組織の免疫染色を行った。結果、GalNAcT3を多く発現している腺細胞の染色が確認された(図2参照)。従って、得られた抗血清はGalNAcT3の測定においても1000~100万倍希釈の範囲で好ましくは2000~10万倍希釈の範囲で使用可能と考えられる。

【0029】試験例1

(1) GalNAcT3発現量の判定

摘出された106例の大腸癌について、パラフィン包埋切片でのGalNAcT3発現量を免疫染色法で判定した。すなわち、実施例1で得られた抗血清を5000倍希釈したものを第一抗体として用い、その後第二抗体としてアルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体を用いて検体を免疫染色することにより判定した。

【0030】図2に正常粘膜組織での染色例を、図3及び4に癌部での染色例を示す。図2に示すように、正常粘膜組織では、全例においてGalNAcT3が細胞質に顆粒状に発現していた。一方、大腸癌106例中67例(63.2%)では、細胞質に顆粒状、若しくはびまん性にGalNAcT3が発現していたが、残りの39例(36.8%)は、図4に示すようにGalNAcT3の発現を認めなかった。

【0031】(2) GalNAcT3の発現と大腸癌の予後規定因子の相関性

GalNAcT3の発現と生存期間の比較を全症例及び組織型別に症例を分類し解析した。判定は、腫瘍組織細胞数の50%以上が染色された場合を陽性、50%未満を陰性とした。

【0032】結果を図5~7に示す。全症例及び高分化型癌の症例において、GalNAcT3陰性症例では5年、10年生存率が有意に低かった。尚、組織型及びステージとは統計学的相関関係は認められなかった。

【0033】

【発明の効果】本発明の予後判定方法を用いることにより、大腸癌、胃癌等の腺癌患者の予後を、経過観察を行わずに簡易に判定することができ、臨床診断や治療法の決定において有力な情報を与える。

【0034】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<10>TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD

<20>A method for judging prognosis

7
 <130>P05031112
 <160>1
 <210>1
 <211>19
 <212>PRT
 <213>Artificial
 <400>1
 Gly Tyr Tyr Thr Ala Ala Glu Leu Lys Pro Val Leu Asp Arg Pro Pro
 1 5 10 15
 Gln Asp Ser
 19

【図面の簡単な説明】

【図1】抗ペプチド抗血清測定条件検討のための検量曲線を示す図である。

【図2】抗GalNAcT3ポリクローナル抗体による正常大腸粘膜の染色結果を示す図である。

【図3】抗GalNAcT3ポリクローナル抗体による大腸癌の染色結果を示す図である。（陽性例）

【図4】抗GalNAcT3ポリクローナル抗体による大腸癌の染色結果を示す図である。（陰性例）

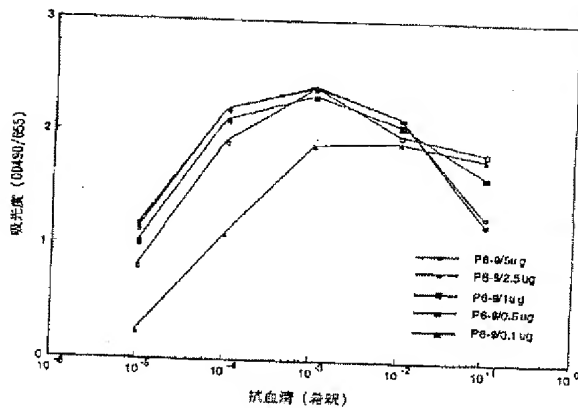
【図5】抗GalNAcT3ポリクローナル抗体による大腸癌（全症例）の染色結果と各症例での生存期間を比*

*較した図である。図中のP値はログランク有意差検定法により求められた有意差を示す。

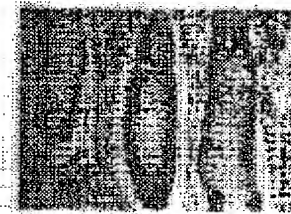
【図6】抗GalNAcT3ポリクローナル抗体による大腸癌（高分化型）の染色結果と各症例での生存期間を比較した図である。図中のP値はログランク有意差検定法により求められた有意差を示す。

【図7】抗GalNAcT3ポリクローナル抗体による大腸癌（中分化型）の染色結果と各症例での生存期間を比較した図である。図中のP値はログランク有意差検定法により求められた有意差を示す。

【図1】



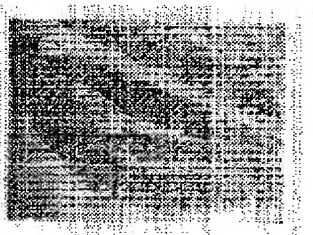
【図2】



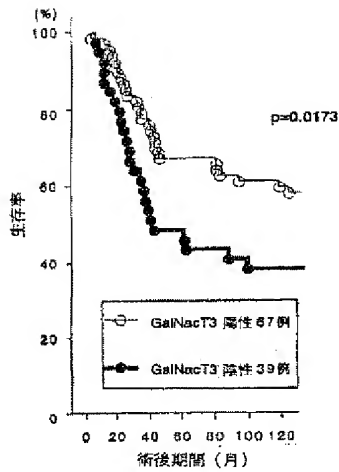
【図3】



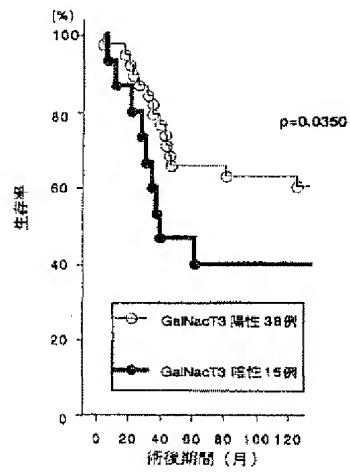
【図4】



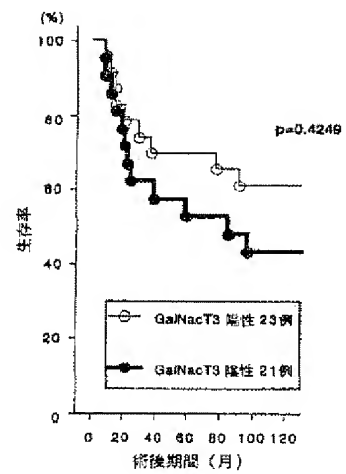
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テーマコード (参考)

// C 1 2 P 21/00

C 1 2 N 15/00

Z N A A

F ターム (参考) 4B024 AA11 BA61

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QR13

QR58 QS03 QS33 QX01

4B064 AG26 CA10 CC24 DA14

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75

EA50 FA71